

プラズマローゲン精密定量法の確立と臨床サンプル測定への応用

著者	乙木 百合香
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17612号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00120801

博士論文内容要約

プラズマローゲン精密定量法の確立と
臨床サンプル測定への応用

Accurate quantitation of plasmalogen molecular species:
Application to clinical samples

東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻
天然物生物機能科学講座 機能分子解析学分野

学籍番号 B3AD1303

乙木 百合香

指導教員 仲川 清隆 教授

平成28年度

緒言

哺乳類の生体膜を構成するグリセリン脂質 (PL) は、*sn*-1 位の脂肪酸がエステル結合したアシル型 (Acyl-PL) とエーテル結合したエーテル型 (Ether-PL) があり、Ether-PL はさらにアルケニル型 (プラズマローゲン; Pls) とアルキル型 (Alkyl-PL) とに分類される (Fig. 1) [1,2]。Pls には、極性基にコリンまたは、エタノールアミンが結合した PC-Pls と PE-Pls が存在する。哺乳類では全リン脂質の約 15-20% が Pls であり、特に脳、心臓、腎臓、精巣、血液に多く分布している [1,3]。これまで Pls の生理機能として、神経保護作用やミエリン形成、細胞膜流動性の安定化、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の貯蔵、シグナル伝達への寄与などが報告されている。また、Pls 合成酵素欠損マウスが、脳や骨格の発達異常、不妊、短命を呈することからも、生体内における Pls の生理的役割に注目が集まっている [4]。さらに近年では、アルツハイマー病 (AD) 者の脳や血中では Pls が大幅に減少することが報告されており、特にドコサヘキサエン酸 (DHA) などの PUFA を有する PE-Pls が病状の亢進に伴い減少することが明らかになっている (Fig. 2A) [5-9]。また、健常者の血清 Pls 解析から、オレイン酸やリノール酸を有する PC-Pls が年齢や低密度リポタンパクコレステロール、動脈硬化症の指標となる各種パラメーターと負の相関をとり、高密度リポタンパクコレステロールとは正の相関を示すことが報告されている (Fig. 2B) [10,11]。さらに Pls が有するビニルエーテル結合は活性酸素の一種である一重項酸素を捕捉することが知られており、炎症、動脈硬化症といった酸化ストレス関連疾患における抗酸化作用も考えられている [12,13]。こうした背景から、Pls の正確な定量だけでなく、その詳細な構成脂肪酸 (Pls 分子種) の解析に興味を持たれている。

Pls の *sn*-1 位の脂肪酸アルコールには、主に飽和脂肪酸もしくはモノ不飽和脂肪酸のパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸が結合している (Fig. 1) [1,2]。さらに *sn*-2 位は主にアラキドン酸や DHA などの PUFA が結合しており、生体内に存在する Pls 分子種は多種多様である。これまで Pls の分析法として様々な方法が報告されているが、特に液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) はこうした構成脂肪酸の解析に有用な手法である [7-11]。しかし、LC-MS/MS は高感度、高選択的な分析法である一方で、精密な定量法には様々な課題 (マトリックス効果、選択性、分析安定性など) がある。こうした問題は分析精度を著しく損なうにもかかわらず、これらが担保された分析法はこれまで報告されていない。

そこで、本研究では、PC-Pls および PE-Pls 分子種の LC-MS/MS による精密定量法を確立し、生体内での機能解明を目指した。第 1 章ではまず、生体サンプル中 Pls 分子種の精密定量を達成し、第 2 章では種々の疾患の血中 Pls 測定を行い、本法の有用性および病態と Pls の関わりについて考察した。第 3 章では、本研究で構築した方法を Pls 分解物、前駆体の定量法へと発展させた。

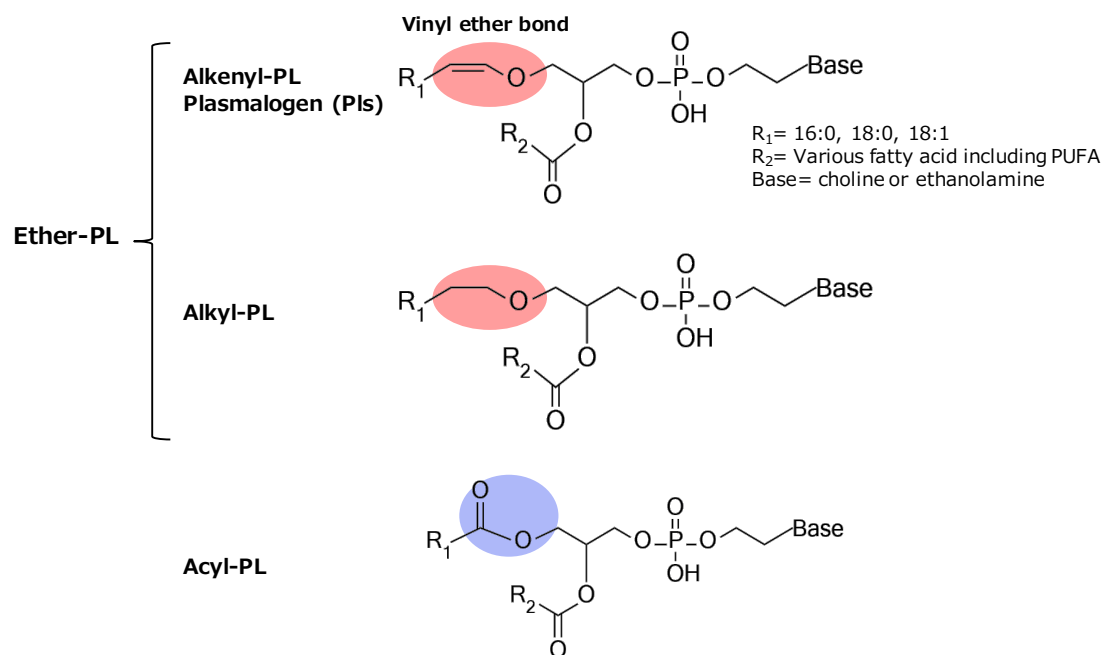


Fig. 1. Structures of glycerophospholipid (PL).

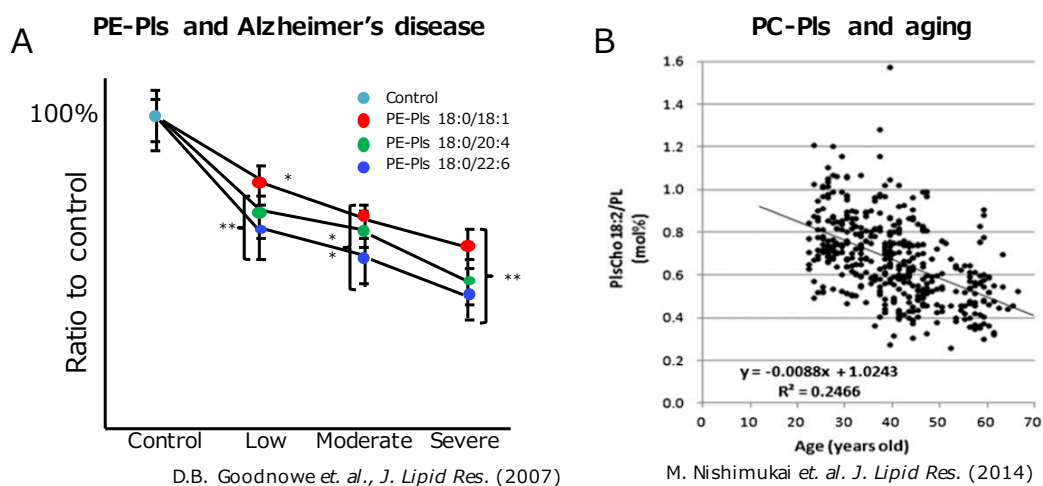


Fig. 2. Blood Pls involves in Alzheimer's disease (A) and aging (B).

第1章 プラズマローゲンの精密定量法の確立

【目的】生体内に存在する Pls の分子種解析には、高感度分析が可能な LC-MS/MS の Multiple Reaction Monitoring (MRM) が最適であると考えられた [7-11]。LC-MS/MS の MRM モードは、目的の化合物の検出に、Q1 で指定したプレカーサーイオンを Q2 で開裂させ、生じたプロダクトイオンのうち特定のイオンのみを Q3 で指定できるため、化合物の構造に基づいた解析が可能な手法である。しかし、精密な定量には、Pls の構造を反映した MRM ペアの構築、高回収率な抽出法やマトリックス効果の回避が必須であるにもかかわらず、Pls の分析にはこういった評価が行われてこなかった。そこで、本章では Pls の精密な定量法を確立するために、Pls 特異的な MRM ペアの探索、マトリックス効果を回避した LC-MS/MS 条件の検討、添加回収試験の評価を行い、血漿中 Pls の精密定量法の確立を目指した。

【方法】標品は6種の Pls 分子種(PC-Pls 18:0/18:1、18:0/20:4、18:0/22:6; PE-Pls 18:0/18:1、18:0/20:4、18:0/22:6)および6種の Acyl-PL 分子種(Acyl-PC 18:0/18:1、18:0/20:4、18:0/22:6; Acyl-PE 18:0/18:1、18:0/20:4、18:0/22:6)の計12分子種を用いた。これら標品を H^+ もしくは Na^+ 存在下で飛行時間型 MS/MS のプロダクトイオンスキャンに供し、Pls 特異的な MRM ペアの探索を行った。LC-MS/MS による精密定量法の構築には四重極型 MS/MS を用いた。また、血漿 Pls はメタノール-タンパク質沈殿法と固相抽出を併せた新たな抽出法によって抽出し、各種バリデーションを行った。

【結果と考察】PC-Pls の H^+ 付加体のプロダクトイオンには、Pls に特徴的なプロダクトイオンは認められなかったが、 Na^+ 付加体からは、*sn*-2 位の脂肪酸、ホスホコリン、ナトリウムがニュートラルロスした m/z 307.3 ($[M+Na-R_2COONa-phosphocholine]^+$) が生じていた

(Fig. 3) [14]。本プロダクトイオンは、PE-Pls にも生じていたため、 m/z 307.3 を MRM ペアとして用いると Pls を高選択的に検出できると考えられた。分離条件を最適化した LC-MS/MS に Pls と Acyl-PL の全12分子種を供したところ、すべての分子種を単一ピークとして分離することができ (Fig. 4)、定量限界は2.5-50 fmol レベルと非常に高感度であった。また、血漿からの Pls 回収率はほぼ100%と高く、分析の信頼性を表す真度と精度も十分であった (Table 1)。これらの結果を担保するようにマトリックス効果は生じておらず (許容範囲: Matrix Factor=100% \pm 10)、血漿中 Pls の精密な定量法が確立された (Table 1) [15]。

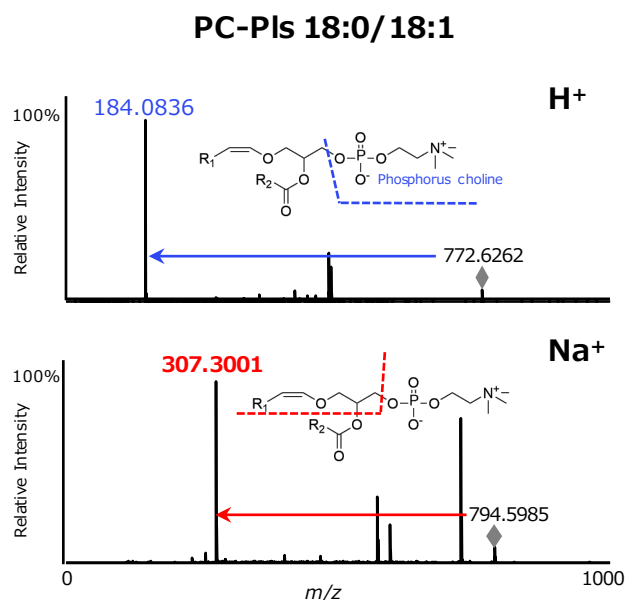


Fig. 3. Product ion mass spectra of PC-Pls 18:0/18:1 in the absence or presence of sodium.

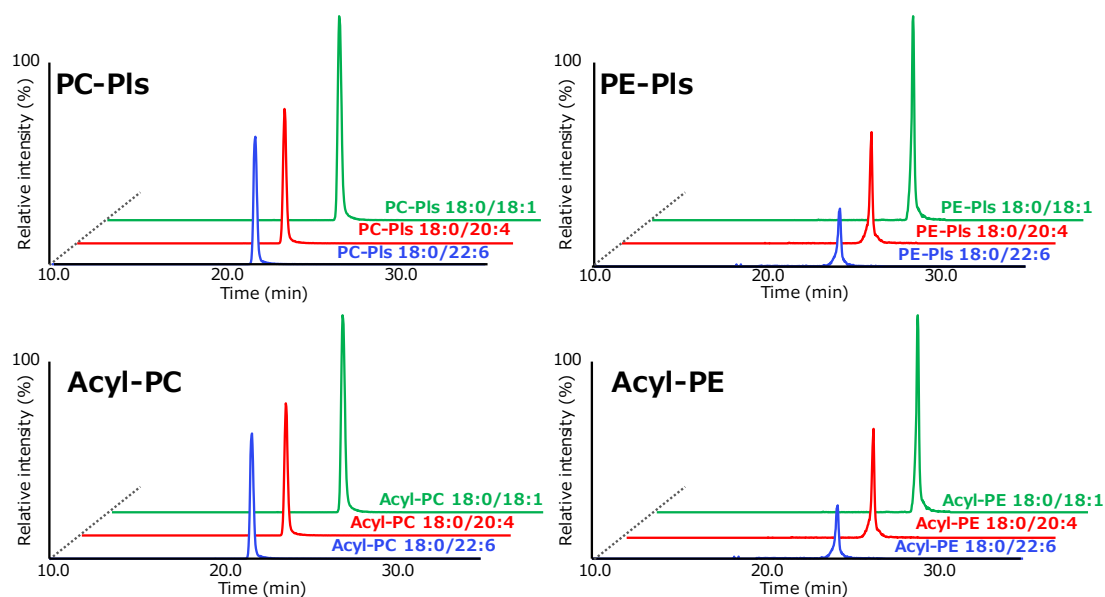


Fig. 4. MRM chromatogram of Pls and Acyl-PL standards in the presence of sodium.

Table 1. Validation of the method; recovery, accuracy, precision, and matrix factor.

		Intra-day			Inter-day			Matrix Factor(%)
		Recovery (%)	Accuracy	Precision	Recovery (%)	Accuracy	Precision	
PC-Pls	18:0/18:1	104.3 ± 0.4	4.3	1.2	97.2 ± 1.0	-2.8	1.0	106.3 ± 5.0
	18:0/20:4	108.3 ± 1.3	8.3	4.3	110.0 ± 1.8	10.0	1.6	98.8 ± 3.7
	18:0/22:6	96.0 ± 0.5	-4.0	1.8	91.2 ± 0.9	-8.8	1.0	102.4 ± 5.2
PE-Pls	18:0/18:1	99.1 ± 0.7	-0.9	2.4	106.5 ± 0.6	6.5	0.5	93.1 ± 2.0
	18:0/20:4	90.9 ± 1.3	-9.1	5.4	100.6 ± 3.0	0.6	2.9	99.2 ± 4.5
	18:0/22:6	108.5 ± 2.5	8.5	8.6	107.7 ± 1.5	7.7	1.4	102.6 ± 6.3
Acyl-PC	18:0/18:1	104.9 ± 2.0	4.9	4.2	96.6 ± 3.4	-3.4	3.5	98.5 ± 3.5
	18:0/20:4	94.6 ± 4.2	-5.4	4.4	95.6 ± 4.2	-4.4	4.4	100.7 ± 4.5
	18:0/22:6	85.7 ± 1.8	-14.3	2.1	88.3 ± 2.1	-11.7	2.3	96.7 ± 6.6
Acyl-PE	18:0/18:1	103.1 ± 1.3	3.1	4.6	106.8 ± 0.9	6.8	0.9	101.2 ± 7.6
	18:0/20:4	109.3 ± 3.7	9.3	12.3	103.8 ± 3.5	3.8	3.4	99.6 ± 2.2
	18:0/22:6	108.0 ± 1.3	8.0	9.1	108.9 ± 1.0	8.9	0.9	102.9 ± 4.0

Data are expressed as means ± SD (n=5).

Acceptance criterion for accuracy and precision were 20%. When Matrix Factors were within 90–110%, the matrix effects were considered negligible.

第2章 ヒト臨床血漿サンプル中のプラズマローゲン解析

【目的】ヒトの血漿中 Pls は、様々な疾患に関与することが示唆されているものの、精密な定量法がなかったために、病態における Pls の機能の詳細は不明であった。そこで、第2章では、第1章において確立された Pls 定量法を用いてヒトの血中 Pls を定量することとした。血中 Pls の減少が知られるアルツハイマー病 (AD)、スクリーニングとして季節性情動性障害 (SAD)、多発性硬化症 (Multiple Sclerosis)、急性膵炎 (AP) 者の血漿または血清中 Pls 濃度を明らかにし、疾患との関わりを考察しようとした。

【方法】AD は、健常者と Mini-Mental State Examination (MMSE) のスコアが平均 27 の Early、19 の Moderate (n=10) の AD 者の血漿を用いた。SAD では、冬季にうつ指標である Beck Depression Inventory II (BDI) が増加する (冬にうつ状態が悪化する) SAD 患者の夏と冬の血漿を用いた (n=9)。Multiple Sclerosis は、健常者 (n=18)、Multiple Sclerosis 者 (Multiple Sclerosis-NI、n=13)、認知症を併発している Multiple Sclerosis 者 (Multiple Sclerosis-I、n=16) の血漿を用いた。AP は、健常者および Mild、Moderate、Severe (n=20) の3ステージの AP 患者の血清を用いた。これらの血漿/血清中 Pls を第1章で確立した分析法にて定量した。

【結果と考察】血中 PE-Pls の減少が報告されている AD に注目し、血漿中 Pls を定量したところ、健常者と比較して大きく差が見られないことがわかった[15]。過去の知見と異なった理由は、N 数が少ないことや分析精度の違いと考えられた[8,15]。次に、AD と同じ中枢神経系疾患である SAD と Multiple Sclerosis の患者の血漿を分析した。SAD では、夏の血漿中 DHA を有する PC-Pls および PE-Pls 濃度と Δ BDI が負の相関を示した (Fig. 5)。また、Multiple Sclerosis では、認知症を同時に発症している Multiple Sclerosis-I 者のみで DHA 型の PE-Pls が減少していた (Fig. 6)。これらから、DHA を有する Pls が中枢神経系疾患に重要であることが示唆された。最後に、AP の血清中 Pls 濃度を定量したところ、病状の亢進に伴ってすべての Pls 分子種が減少していた。この理由として、血中での酸化ストレス増大に従い [16]、Pls の抗酸化能が発揮されたことや、PLA2 によって Pls が分解されたことが示唆された[17]。

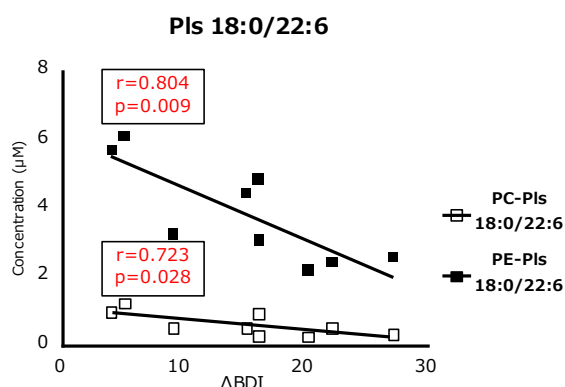


Fig. 5. Spearman's correlation between the change in BDI and summer Pls 18:0/22:6 concentrations in plasma from SAD patients.

SAD, Seasonal Affective Disorder; BDI, Beck Depression Inventory

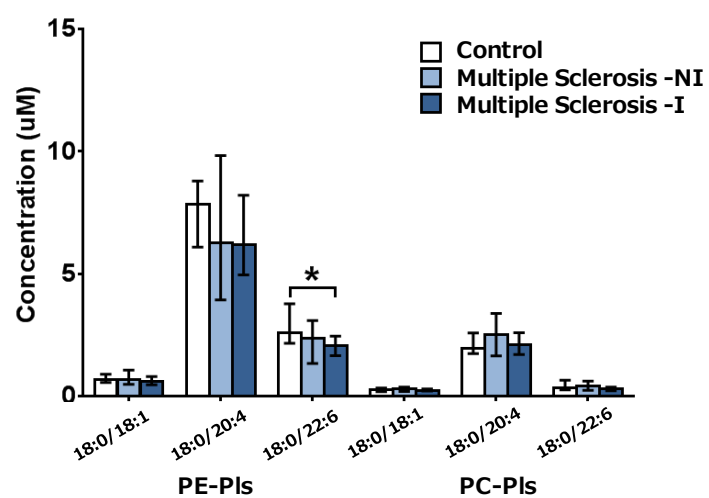


Fig. 6. Circulating Pls species in patients with multiple sclerosis and age-matched controls.

Data are expressed as median \pm interquartile range.

Significant differences were determined using the Kruskal-Wallis test. $*p < 0.05$ (n=13-18)

Multiple Sclerosis -NI, Multiple Sclerosis patients without cognitive impairment;

Multiple Sclerosis -I, Multiple Sclerosis patients with cognitive impairment

第3章 エーテルリン脂質網羅的定量解析への応用

【目的】第2章において血中 Pls が種々の疾患において低下することを明らかにした。この減少原因として、1) Pls 分解、2) Pls 合成系の低下が考えられる。1) は、PLA1 や酸化による *sn*-1 位の開裂もしくは PLA2 による *sn*-2 位の脂肪酸の切断があげられる。結果として前者では Lyso Acyl-PL が、後者では Lyso Pls が産生する[1,2]。2) については、ペルオキシソームの活性低下が考えられる。Pls はペルオキシソーム内で特異的に合成が開始され、合成中間体である Alkyl-PL が還元されて Pls となる[2]。これらのことから、Pls だけでなく、その分解物や合成中間体である Lyso Acyl-PL や Lyso Pls または Alkyl-PL の増減を明らかにすることで、Pls の減少原因を推定できると考えられる。しかしながら、これらを分子種レベルで一斉に精密定量する方法は報告されていない。そのため、本章では、Pls だけでなく、その分解物や合成中間体を精密定量できる分析法の確立を目指した。

【方法と結果】標準品は、Alkyl-PC を 3 分子種 (Alkyl-PC 16:0/18:1、16:0/20:4、16:0/22:6)、Lyso-Pls を 4 分子種 (Lyso PC-Pls 16:0、18:0; Lyso PE-Pls 16:0、18:0)、Lyso Acyl-PL を 5 分子種 (Lyso Acyl-PC 16:0、17:0、18:0; Lyso Acyl-PE 16:0、18:0)、Lyso Alkyl-PC を 4 分子種 (Lyso Alkyl-PC 16:0、17:0、18:0、18:1) 計 16 分子種用いた。プロダクトイオンスキャンおよび LC-MS/MS 分析は第1章の方法をもとに最適化した。

【結果と考察】第1章の方法を応用し、ナトリウム存在下にて Alkyl-PC、Lyso Pls、Lyso Acyl-PL、Lyso Alkyl-PC 計 16 分子種をそれぞれプロダクトイオンスキャンに供し、MRM ペアを決定した (Fig. 7)。次いで Pls と Acyl-PL も加えた全 28 分子種の LC-MS/MS 条件を最適化し、これらの分離を達成した (Fig. 8)。第1章と同様の方法にて血漿からの抽出を行うと、Alkyl-PC と Lyso PE を安定かつ高回収率で抽出できた (Table 2)。Lyso PC は、生体内に存在しない Lyso Alkyl-PC 17:0 を内部標準として用いて回収率を補正すると信頼性高く抽出ができた (Table 2)。また、感度を著しく低下させるイオンサプレッションも生じていなかった。そのため、血漿中 Pls、Acyl-PL、Alkyl-PL およびこれらの Lyso 体を含む全 28 分子種の精密定量法が確立された。本法は、*in vivo* での Pls の機能解明に大いに役立つと期待される。

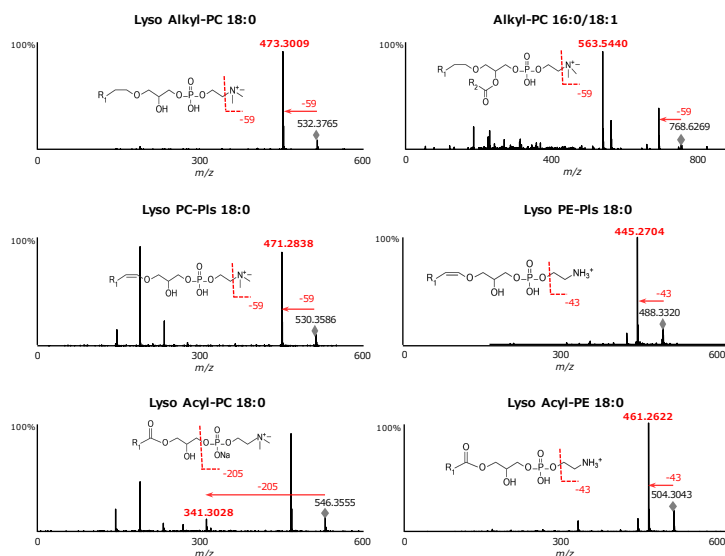


Fig. 7. Product ion mass spectra in the presence of sodium.

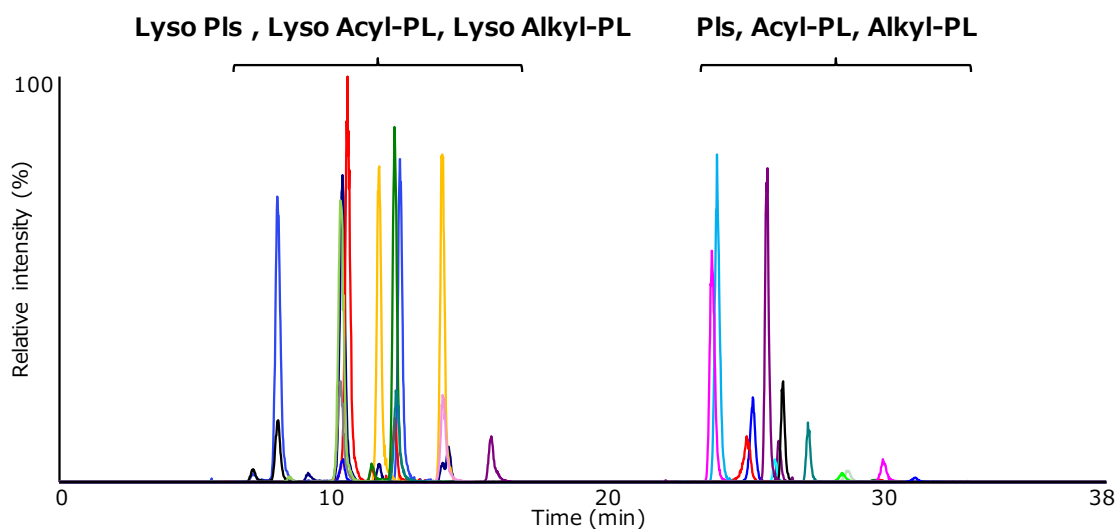


Fig. 8. MRM chromatogram of PL standards in the presence of sodium.

Table 2. Validation of the method; recovery, accuracy, precision.

		Intra-day				Inter-day			
		Recovery (%)	Recovery (%)	* Accuracy	Precision	Recovery (%)	Recovery (%)	* Accuracy	Precision
Alkyl-PC	16:0/18:1	107.9 ± 0.3	—	7.9	2.7	106.0 ± 18.2	—	6.0	8.0
	16:0/20:4	103.1 ± 1.8	—	3.1	5.3	104.5 ± 7.4	—	4.5	2.9
	16:0/22:6	102.5 ± 0.7	—	2.5	5.7	110.0 ± 6.5	—	10.0	0.3
Lyso PC-Pls	16:0	72.3 ± 1.4	105.9 ± 2.1	-5.9	3.3	73.4 ± 6.1	113.3 ± 9.4	13.3	11.8
	18:0	77.6 ± 3.4	113.7 ± 5.0	-13.7	3.2	73.8 ± 10.7	113.9 ± 15.6	13.9	9.3
Lyso PE-Pls	16:0	93.9 ± 0.5	—	-6.1	1.3	96.0 ± 4.0	—	-4.0	5.4
	18:0	95.8 ± 6.6	—	-4.2	5.6	95.6 ± 4.4	—	-4.4	4.8
Lyso Acyl-PC	16:0	67.4 ± 3.8	98.7 ± 5.6	1.3	4.2	70.2 ± 3.7	108.4 ± 5.6	8.4	0.9
	17:0	68.2 ± 2.5	99.9 ± 3.7	0.1	3.1	73.1 ± 5.3	112.8 ± 7.8	12.8	3.3
	18:0	67.9 ± 2.7	99.5 ± 4.0	0.5	2.2	76.0 ± 7.1	117.3 ± 11.0	17.3	3.9
Lyso Acyl-PE	16:0	92.7 ± 0.8	—	-7.3	1.9	87.7 ± 12.3	—	-12.3	3.9
	18:0	94.9 ± 6.7	—	-5.1	2.2	93.1 ± 6.9	—	-6.9	3.0
Lyso Alkyl-PC	16:0	67.3 ± 1.7	98.6 ± 2.5	1.4	1.4	60.5 ± 6.0	93.3 ± 9.2	-6.7	8.5
	17:0	68.3 ± 0.3	100.0 ± 0.4	0.0	2.6	64.8 ± 3.4	100.0 ± 5.3	0.0	5.3
	18:0	62.0 ± 2.2	90.8 ± 3.2	9.2	7.0	70.5 ± 14.8	108.8 ± 22.8	8.8	3.4
	18:1	71.9 ± 1.0	105.2 ± 1.5	-5.2	2.8	64.5 ± 6.6	99.6 ± 10.1	-0.4	9.5

Data are expressed as means ± SD (n=5).

* Recovery corrected by Lyso Alkyl-PC 17:0

総括

本博士論文では、Pls と疾患の発症・進展との関係解明を目的とし、質量分析を用いた Pls の精密定量法を構築した。

第1章では、Pls の LC-MS/MS 分析の足かせとなっていた問題を解決した。まず、これまで Pls の特異的な検出が困難であったが、ナトリウムを用いることで Pls の高選択的な分析が可能になることを明らかにした[14]。LC-MS/MS 条件を最適化したところ、その定量限界は fmol レベルであり、高感度に分析できることがわかった。続いて、血漿から簡便かつ信頼性高く Pls を抽出できる方法を新たに構築した。これらの方法において、感度を著しく低下させるイオンサプレッションも生じておらず、血漿 Pls の高選択的、高感度、高精度な定量方法が確立された[15]。

第2章では、第1章で構築した Pls の定量法を臨床サンプルへ応用し、Pls に関わると予想される疾患のスクリーニングを行った。その結果、AD 者の血漿では、従来の報告とは異なり健康者と比較して Pls 濃度に差がなかった[15]。今後、サンプル数を拡大し、さらに詳細な分析を進める予定である。また、SAD 者の血漿では、うつ病の亢進度と夏の血漿中 DHA 型 Pls 濃度が負の相関を示しており、Multiple Sclerosis では、認知症を発症している Multiple Sclerosis 者の血漿のみで DHA 型の PE-Pls が優位に低値であった。そのため、DHA 型の Pls がうつ病や認知症において重要であることが示唆された。さらに AP 者においては、病態の進行に伴い、Pls が選択的に減少していたため、酸化ストレスや PLA2 によって Pls が減少したと考えられた。以上のことから、Pls の生理機能は分子種ごとに異なること、および疾患において、Pls が抗酸化能など様々な機能を有している可能性が示された。

第3章では、第2章で明らかにした Pls の減少原因の詳細を明らかにするため、Pls の分解物 (Lyso Pls、Lyso Acyl-PL) や、合成中間体 (Alkyl-PL、Lyso Alkyl-PL) の定量法の確立を目指した。まず、第1章のナトリウムを用いた MS/MS 方法が、Alkyl-PL や Lyso PL の解析にも応用可能であることを示した。Alkyl-PC、Lyso Pls、Lyso Acyl-PL、Lyso Alkyl-PL に加えて Pls と Acyl-PL の 28 分子種を分離できるように LC 条件を最適化したところ、すべての分子種を明瞭なピークで検出できた。血漿からも Alkyl-PL、Lyso Pls、Lyso Acyl-PL、Lyso Alkyl-PL を信頼性高く抽出でき、本条件下ではイオンサプレッションも生じていないことから、これらの精密定量法が確立された。本法は、*in vivo* での Pls の生理学的な機能や疾患との関わりを明らかにするのに極めて有用であると考えられる。

本研究により、生体内での Pls とその分解物 (Lyso Pls、Lyso Acyl-PL)、合成中間体 (Alkyl-PL、Lyso Alkyl-PL)、および Acyl-PL の分子種を精密に定量することが可能となった。本法により、Pls の生体内での挙動が明らかにされ、その機能や病態との関係解明に役立つと期待される。

引用文献

- [1] P. Brites, H.R. Waterham, R.J.A. Wanders. Function and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1636 (2004) 219-231.
- [2] N.E. Braverman, A.B. Moser. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1822 (2012) 1442-1452.
- [3] C. Burautigam, B. Engelmann, D. Reiss, U. Reinhardt, W.O. Richter, T. Brosche. Plasmalogen phospholipids in plasma lipoproteins of nomolipidemic donors and patients with hydropcholelomia treated by LDL apheresis. *Atherosclerosis.* 119 (1996) 77-88.
- [4] N. Braverman, R. Zhang, L. Chen, G. Nimmo, S. Scheper, T. Tran, R. Chaudhury, A. Moser, S. Steinberg. A Pex7 hypomorphic mouse model for plasmalogen deficiency affecting the lens and skeleton. *Mol. Gen. Meta.* 99 (2010) 408-416.
- [5] L. Ginsberg, S. Rafique, J.H. Xuereb, S.I. Rapoport, N.L. Gershfeld. Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* 698 (1995) 223-226.
- [6] M. Igarashi, K. Ma, F. Gao, H.W. Kim, S.I. Rapoport, J.S. Rao. Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex. *J. Alzheimer Dis.* 24 (2011) 507-517.
- [7] X. Han, D.M. Holtzman, D.W. McKeel Jr. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J. Neurochem.* 77 (2001) 1168-1180.
- [8] D.B. Goodenowe, L.L. Cook, J. Liu, Y. Lu, D.A. Jayasinghe, P.W. Ahiahonu, D. Heath, Y. Yamazaki, J. Flax, K.F. Krenitsky, D.L. Sparks, A. Lerner, R.P. Friedland, T. Kudo, K. Kamino, T. Morihara, M. Takeda, P.L. Wood. Peripheral ethanolamine plasmalogen deficiency: a logical causative factor in Alzheimer's disease and dementia. *J. Lipid Res.* 48 (2007) 2485-2489.
- [9] S. Yamashita, T. Kiko, H. Fujiwara, M. Hashimoto, K. Nakagawa, M. Kinoshita, K. Furukawa, H. Arai, T. Miyazawa. Alterations in the levels of amyloid-beta, phospholipid hydroperoxide, and plasmalogen in the blood of patients with Alzheimer's disease: possible interactions between amyloid-beta and these lipids. *J. Alzheimers Dis.* 50 (2015) 527-537.
- [10] M. Nishimukai, R. Maeba, Y. Yamazaki, T. Nezu, T. Sakurai, Y. Takahashi, S.P. Hui, H. Chiba, T. Okazaki, H. Hara. Serum choline plasmalogens, particularly those with oleic acid in *sn*-2, are associated with proatherogenic state. *J. Lipid Res.* 437 (2014) 147-154.
- [11] I. Sutter, R. Klingenberg, A. Othman, L. Rohrer, U. Landmesser, D. Heg, N. Rodondi, F. Mach, S. Windecker, C.M. Matter, T.F. Luscher, A. von Eckardstein, T. Hornemann. Decreased phosphatidylcholine plasmalogens- A putative novel lipid signature in patients with stable coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 246 (2016) 130-140.
- [12] D. Reiss, K. Beyer, B. Engelmann. Oxidative degradation of polyunsaturated diacyl phospholipids in the presence of plasmalogen. *J. Biochem.* 323 (1997) 807-814.
- [13] R.C. Murphy. Free radical-induced oxidation of arachidonyl plasmalogen phospholipids: Antioxidant mechanism and precursor pathway for bioactive eicosanoids. *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 463-472.
- [14] Y. Otoki, K. Nakagawa, S. Kato, T. Miyazawa. MS/MS and LC-MS/MS analysis of

choline/ethanolamine plasmalogens via promotion of alkali metal adduct formation. *J. Chromatogr. B* 1004 (2015) 85-92.

- [15] Y. Otoki, S. Kato, F. Kimura, K. Furukawa, S. Yamashita, H. Arai, T. Miyazawa, K. Nakagawa. Accurate quantitation of choline and ethanolamine plasmalogen molecular species in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 134 (2016) 77-85.
- [16] S. Chooklin, A. Pereyaslov, I. Bihalskyy. Pathogenic role of myeloperoxidase in acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 8 (2009) 627-631.
- [17] M.S. Zhang, K.J. Zhang, J. Zhang, X.L. Jiao, D. Chen, D.L. Zhang. Phospholipases A-II (PLA2-II) induces acute pancreatitis through activation of the transcription factor NF-kappaB. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 18 (2014) 1163-1169.